

## Résumé

L'étude de la variation de quatre paramètres biologiques : extrait sec, teneurs en phosphore inorganique, en thiols et en saccharose, sur les clones PB 235, GT 1 et BP 217, en fonction d'intervalles de temps entre deux saignées allant de 1 à 14 jours, permet d'expliquer les mécanismes de régénération du latex. Cette étude explique aussi les différences de capacité à produire de ces clones et leur réponse potentielle à des traitements de stimulation. L'exploitation des clones en fonction de leur typologie métabolique apparaît alors évidente.

## Abstract

A study of the variation in four biological parameters: dry extract, inorganic phosphorus, thiols and sucrose contents, in clones PB 235, GT 1 and BP 217 according to the time lapse between two tappings, ranging from 1 to 14 days, provided an explanation of latex regeneration mechanisms. This study also explained the differences in the production abilities of these clones and their potential response to stimulation treatments. It thus becomes clear that clones should be tapped in accordance with their metabolic typology.

## Resumen

El estudio de la variación de cuatro parámetros biológicos: extracto seco, contenidos de fósforo inorgánico, de tioles y de sacarosa, en los clones PB 235, GT 1 y BP 217, con arreglo a intervalos de tiempo entre dos picas yendo de 1 a 14 días, permite explicar los mecanismos de regeneración del látex. Este estudio explica también las diferencias de capacidad a producir de estos clones y su respuesta potencial a tratamientos de estimulación. La explotación de los clones con arreglo a su tipología metabólica parece entonces evidente.

# Typologie clonale du fonctionnement des laticifères chez *Hevea brasiliensis*

Jacob J.L., Prévôt J.C., Lacrotte R., Clément A., Serres E., Gohet E.

CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

Chez l'*Hevea brasiliensis* deux facteurs peuvent limiter la production du latex : son écoulement et sa régénération. Plus le premier est aisé et se prolonge, plus la récolte est importante. La régénération *in situ* doit être suffisamment active pour compenser la perte de matière cellulaire entre deux saignées. Elle joue donc un rôle majeur dans le potentiel de production d'un hévéa.

Si les processus généraux de la régénération sont maintenant connus (Jacob *et al.*, 1989a), il est apparu que leur dynamique de fonctionnement dépend des clones et explique en grande partie leurs caractéristiques de production (Serres *et al.*, 1988).

Une étude cinétique de la régénération du latex en fonction du temps s'écoulant entre deux saignées et qui prend en compte divers paramètres biologiques du latex, a été réalisée sur le clone GT 1 (Jacob *et al.*, 1988). Elle montre la relation entre l'activité biochimique du système laticifère et la reconstitution de son contenu. Le présent travail a comparé cette cinétique, dans des conditions analogues, chez trois clones : PB 235, GT 1 et BP 217, dont le fonctionnement métabolique est sensiblement différent. Les résultats obtenus sont discutés en fonction des caractéristiques de chacun de ces clones à produire et à réagir aux

traitements à l'Ethrel utilisé pour stimuler leur production.

## Matériel et techniques

Les trois clones étudiés, GT 1, PB 235 et BP 217, sont dans leur 4<sup>e</sup> année de saignée, l'encoche exploitée sur écorce vierge se situe à une même hauteur sur le tronc (60 cm du sol). Pour chaque clone, des groupes de 10 arbres, représentant chacun un traitement, sont saignés en demi-spirale (1/2S) à 6 fréquences différentes : tous les jours (J/1), tous les 2 jours (J/2), tous les 3 jours (J/3), tous les 4 jours (J/4), toutes les semaines (J/7) et toutes les 2 semaines (J/14). Il n'y a pas de saignées le dimanche, les jours comptés sont des jours ouvrés.

Le latex analysé correspond au latex récolté entre la 5<sup>e</sup> et la 35<sup>e</sup> minute de la saignée.

Les paramètres étudiés : l'extrait sec (ES), le phosphore inorganique (Pi), les thiols (R-SH), le saccharose (SAC), ont été analysés dans le latex frais selon les méthodes déjà décrites (Eschbach *et al.*, 1984).

Les analyses présentées dans ce travail ont été faites 3 mois après le début de l'expérience afin que les différents traitements soient équilibrés par rapport à la saignée en 1/2S tous les 4 jours qui était utilisée précédemment pour l'exploitation de ces arbres.

## Résultats

### L'extrait sec (ES)

Ce paramètre reflète l'activité de la régénération du latex au sein des laticifères. Chez les trois clones, l'ES augmente d'autant plus que l'écart entre deux saignées s'accroît. En effet, la reconstitution de leur matériel cellulaire, et surtout du cis-polyisoprène qui représente plus de 90 % de l'extrait sec, nécessite logiquement un certain temps pour être complète (figure 1). On remarque que les cinétiques obtenues sont toutes d'allure asymptotique mais différentes selon les clones.

Le PB 235 montre des valeurs mesurées pour les saignées journalières plus élevées que chez le GT 1 ou le PB 217. Elles passent, assez rapidement, de 40 à 50 %. Pour la fréquence J/4, l'ES est déjà proche de celui mesuré pour la fréquence J/14.

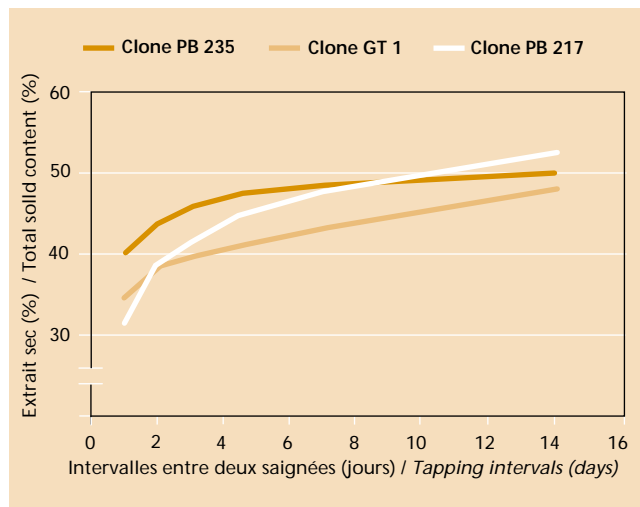
En revanche, le PB 217 se démarque avec des valeurs qui évoluent de 31 % pour la fréquence J/1 à 51 % pour la fréquence J/14, et l'ES est significativement plus faible en J/7 qu'en J/14, montrant ainsi que la régénération *in situ* se poursuit durant cette période.

Le GT 1 se situe dans une position intermédiaire.

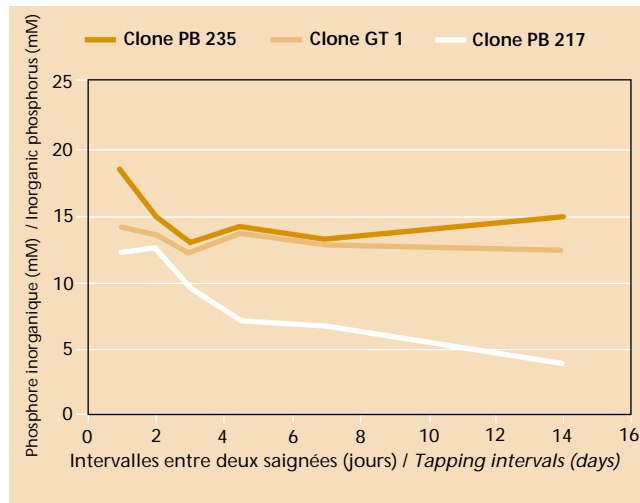
Il apparaît donc que le clone PB 235 a un processus de régénération plus rapide que le GT 1 et surtout que le PB 217.

### La teneur en phosphore inorganique (Pi)

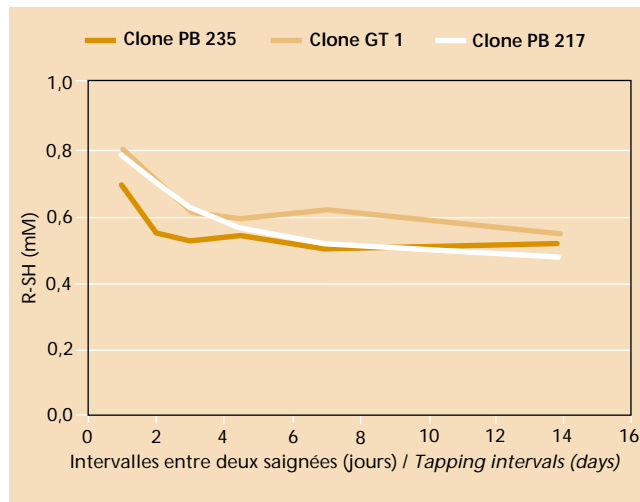
Elle est souvent liée à l'activité métabolique du système laticifère (Jacob *et al.*, 1989b). En effet, cette molécule est impliquée dans les processus énergétiques de l'anabolisme cellulaire et notamment de la synthèse isoprénique par l'intermédiaire des adénosines phosphates et des liaisons pyrophosphates (Lynen, 1969). A ce titre, il est logique que le latex provenant des saignées journalières, où le système laticifère est le plus actif, présente effectivement les valeurs de Pi les plus fortes. Ces valeurs ont tendance à diminuer avec l'augmentation des intervalles de saignées (figure 2), baisse qui correspond au ralentissement de l'activité métabolique. Cette diminution est peu sensible chez GT 1 ; elle s'exprime surtout entre les fréquences J/1 et J/3 pour le PB 235, mais elle est très importante chez le PB 217 où la teneur en Pi s'avère très faible dans le latex des arbres saignés en J/14.



**Figure 1.** Variations de l'extrait sec du latex en fonction des fréquences de saignées chez trois clones : PB 235, GT 1 et PB 217. *Latex dry extract variations according to tapping frequencies for three clones: PB 235, GT 1 and PB 217.*



**Figure 2.** Variations des en Pi du latex en fonction des fréquences de saignées chez trois clones : PB 235, GT 1 et PB 217. *Pi variations according to tapping frequencies for three clones: PB 235, GT 1 and PB 217.*



**Figure 3.** Variations des teneurs en R-SH en fonction des fréquences de saignées chez trois clones : PB 235, GT 1 et PB 217. *R - SH variations according to tapping frequencies for three clones: PB 235, GT 1 and PB 217.*

Il est à noter par ailleurs, que dans le latex des arbres saignés en J/1, les teneurs en Pi les plus élevées se trouvent chez PB 235, elles sont intermédiaires chez GT 1 et plus faibles chez PB 217. Ces résultats recoupent d'autres précédemment trouvés (Serres *et al.*, 1988) et

confirment la liaison entre la teneur en phosphate du latex et l'activité métabolique du système laticifère exploité.

### La teneur en thiols (R-SH).

Ces molécules jouent un rôle important au sein des laticifères. Elles sont suscep-

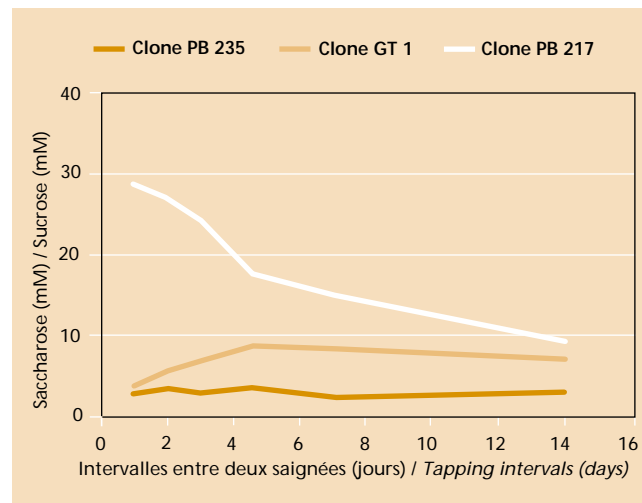
tibles d'activer certains systèmes enzymatiques clefs du métabolisme, telle que l'invertase (Jacob *et al.*, 1982), mais surtout de protéger les structures des organites subcellulaires et leur fonctionnalité en piégeant les molécules d'oxygène toxique générées par certaines réactions enzymatiques nocives (Chrestin, 1985).

Ces R-SH sont constitués de cystéine et surtout de glutathion réduit (McMullen, 1960). Ce dernier représente, selon les clones, 50 à 80 % de l'ensemble des thiols (Clément, communication personnelle). Leur *turn-over* au sein du latex est complexe. Il dépend des systèmes susceptibles de les oxyder et de ceux capables de les régénérer sous leur forme réduite, tels que la glutathion réductase (Prévôt *et al.*, 1984) mais également de les synthétiser à partir de glutamate et de cystéine. Ce dernier processus nécessite de l'énergie biochimique sous forme d'ATP (Hell et Bergman, 1990).

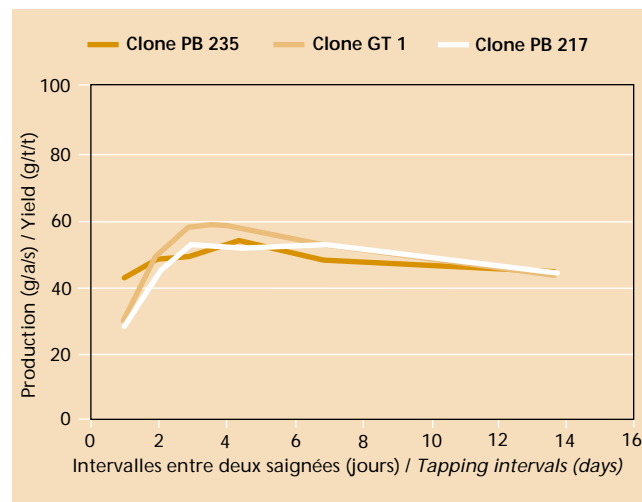
La teneur en R-SH est, dans tous les cas, plus élevée dans les latex provenant de saignées journalières (figure 3) où l'activité métabolique est la plus forte et par conséquent, l'énergie biochimique disponible la plus élevée. Dans les systèmes laticifères les plus actifs biologiquement, les fortes concentrations trouvées sont probablement dues à une synthèse de R-SH plus forte, et notamment de glutathion. Cette synthèse compense aisément les processus oxydatifs eux-mêmes accélérés par l'activation métabolique induite par la saignée, ou éventuellement par la stimulation (Chrestin, 1985). Lorsque la fréquence de saignée décroît, ce qui implique une régénération plus étalée dans le temps et une activité métabolique plus faible, les concentrations en R-SH diminuent puis se stabilisent. Ce phénomène d'équilibre est rapidement atteint chez le PB 235 (dès J/2), plus lentement chez le GT 1 (en J/3) et seulement en J/7 chez le PB 217. Cette différence de cinétique peut être rapprochée du «gradient d'activité métabolique» constaté chez ces trois clones dans le cas de la régénération de l'extrait sec (figure 1).

#### La teneur en saccharose (SAC)

Le sucre, essentiellement sous forme de saccharose (Tupy et Résing, 1968 ; d'Auzac et Pudarnisclé, 1959), est la molécule de base du métabolisme au sein des laticifères ; il représente en effet le substrat initial de la synthèse isoprénique et des processus capables de pro-



**Figure 4.** Variations des teneurs en saccharose en fonction des fréquences de saignées chez trois clones : PB 235, GT 1 et PB 217. *Latex sucrose content variations according to tapping frequencies for three clones: PB 235, GT 1 and PB 217.*



**Figure 5.** Production par arbre et par saignée en fonction des fréquences de saignées chez trois clones : PB 235, GT 1 et PB 217. *Yield per tree per tapping according to tapping frequencies for three clones: PB 235, GT 1 and PB 217.*

duire l'énergie biochimique nécessaire à la régénération du latex *in situ*, telle que la glycolyse. L'activité des tissus laticifères peut donc dépendre de la disponibilité en saccharose (Tupy, 1989).

La teneur du latex en sucre résulte de son approvisionnement et de son utilisation *in situ*.

La pénétration du saccharose dans les laticifères est complexe et met en jeu, au niveau du plasmalemm, comme chez de nombreuses plantes, des mécanismes nécessitant de l'énergie biochimique (Klaphale et Rennenberg, 1990). Des travaux récents (Lacrotte *et al.*, 1991 ; Bouteau, 1994) ont montré qu'il existait chez l'hévéa une ATPase membranaire liée à la pénétration du saccharose *in situ*.

Il est intéressant de constater que la cinétique de la variation des concentrations en saccharose, en fonction des intervalles de saignées, est totalement différente selon les trois clones étudiés (figure 4).

Les teneurs en sucre du PB 235 restent toujours très faibles.

Chez GT 1, les arbres saignés en J/1 ont la teneur en saccharose la plus faible. Dans ce cas, où le système laticifère est le plus sollicité, l'utilisation de cette molécule est très rapide. Lorsque l'intervalle entre deux saignées augmente, l'activité de régénération diminue, mais le processus d'approvisionnement toujours actif permet d'expliquer l'augmentation de la teneur en saccharose. Cette augmentation est maximale pour un intervalle de saignées de 4 jours, puis se stabilise et tend ensuite à décroître.

Chez PB 217, les teneurs en sucre du latex décroissent proportionnellement avec l'augmentation de l'intervalle de saignées. Très fortes chez les arbres exploités tous les jours et dont les laticifères fortement sollicités ont un métabolisme intense, elles chutent ensuite significativement pour se situer seulement à 30 % de la valeur maximale chez les arbres saignés en J/14.

### Production par arbre, par saignée et productions cumulées

Les résultats obtenus en production par arbre et par saignée (figure 5) montrent une analogie chez les clones GT 1 et PB 217. Les arbres saignés quotidiennement donnent la production journalière la plus basse. Le délai entre deux récoltes est trop faible pour que le contenu des laticifères soit totalement régénéré. L'optimum se situe entre J/3 et J/4 avec, dans ce cas, des valeurs significativement plus hautes. En J/14, la production tend à diminuer confirmant des résultats antérieurs obtenus chez GT 1 (Jacob *et al.*, 1988).

Pour PB 235, non seulement la production par arbre et par saignée est plus élevée pour les saignées quotidiennes (43 g) que pour les deux autres clones (respectivement 30 et 33 g pour le PB 217 et le GT 1), mais l'augmentation de ce paramètre pour les intervalles de saignées plus longs est moins importante. Autrement dit, le phénomène de régénération est plus rapide, ce qui confirme une activité métabolique plus intense.

Pour tous les clones, les saignées les plus fréquentes impliquent une activité métabolique plus intense pour compenser une perte de matériel cellulaire plus élevée. Elles se traduisent *in fine* par une production cumulée, également plus forte (tableau 1). Corrélativement, les saignées plus espacées montrent un cumul de récolte bien plus faible, ce qui implique un effort de régénération atténué. En outre, globalement, les productions cumulées sont les plus fortes chez PB 235, et les plus faibles chez PB 217. Celles de GT 1 se situent en position intermédiaire.

## Conclusions

L'étude des caractéristiques du latex et de sa production, en fonction de différents intervalles de saignées, nous renseigne sur les cinétiques de régénération *in situ* et sur l'état physiologique du système laticifère.

Les paramètres étudiés tendent à confirmer cette évolution de l'activité métabolique en liaison avec la fréquence de l'exploitation.

Les courbes asymptotiques caractérisant les variations de l'ES, indiquent que la synthèse tend à ralentir sinon à s'arrêter lorsque l'intervalle entre deux saignées s'accroît suffisamment. Les teneurs en R-SH, dont la reconstitution demande de l'énergie biochimique, diminuent éga-

Tableau 1. Production en gramme par arbre cumulée depuis le début de l'expérience. / *Cumulated yields in grammes per tree since the beginning of the experiment.*

Intervalles de temps entre les saignées <i>Tapping frequencies</i>	PB 235	GT 1	PB 217
J/1 / d/1	3 499	3 055	2 882
J/2 / d/2	2 371	2 239	2 250
J/3 / d/3	1 780	1 813	1 657
J/4 / d/4	1 507	1 545	1 102
J/7 / d/7	899	887	732
J/14 / d/14	537	470	365

lement dans les laticifères moins sollicités et par conséquent, métaboliquement moins actifs. Les variations des concentrations en Pi, reflet de l'activité biochimique cellulaire, confirment ces résultats.

Les variations des teneurs en sucre font cependant ressortir que les trois clones réagissent différemment et possèdent un fonctionnement métabolique qui leur est propre.

En effet, PB 235 présente toujours des concentrations faibles de saccharose. Sa production importante, son ES élevé, son Pi fort, sa régénération rapide entre deux saignées indiquent une activité biosynthétique élevée, qui implique une utilisation rapide du saccharose et, par conséquent, explique sa faible teneur. Toutefois, cette faible teneur résulte aussi d'une disponibilité et d'une alimentation en saccharose qui compensent à peine son utilisation. Pour PB 235, dont l'écoulement aisé et la bonne production vont de pair avec l'activité métabolique élevée de ses laticifères, cette caractéristique peut aussi être un handicap. En effet, dans le cas où une exploitation trop intensive conduit à une consommation de sucre encore plus importante, l'alimentation glucidique peut devenir insuffisante et susceptible de provoquer un dysfonctionnement cellulaire. A cet égard, il faut rappeler la réponse relativement faible du PB 235 à la stimulation et sa propension à développer de l'encoche sèche particulièrement à la suite de traitements à l'Ethrel.

Le cas du PB 217 est très différent. En effet, c'est dans les systèmes laticifères les plus exploités que la teneur en saccharose est la plus élevée. Dans ces conditions, les mécanismes d'alimentation en sucre fonctionnent plus vite que son métabolisme. Ce phénomène résulte probablement d'une activation maximale des processus de pompage impliqués dans l'alimentation (tels que l'ATPase

plasmalemmique), allée à une disponibilité glucidique plus importante. Avec la décélération du métabolisme, induite par l'augmentation des intervalles de saignées, le transfert du saccharose dans la cellule décroît, et l'équilibre alimentation-utilisation conduit à une diminution significative de la concentration en sucre. Cette caractéristique d'un métabolisme laticifère globalement moins actif, allié à des réserves glucidiques utilisables beaucoup plus fortes, peut expliquer la production moins élevée du PB 217 non stimulé (tableau 1), mais aussi sa bonne réponse à la stimulation par l'Ethrel, sa résistance à l'encoche sèche dans le cas de stimulation relativement intense et son potentiel de production élevé (Serres *et al.*, 1988).

La situation du GT 1 est intermédiaire. L'évolution de la teneur en sucre montre que les valeurs les plus faibles correspondent aux latex issus de saignées journalières. Elles tendent ensuite à augmenter sensiblement jusqu'à la saignée en J/4, ce phénomène peut s'expliquer par une alimentation en sucre qui devient supérieure à son utilisation. Au-delà, l'équilibre entre ces processus se stabilise ; cependant une tendance à une diminution de la concentration glucidique en J/14 laisse présager, pour des intervalles de saignées encore plus longs, le même phénomène que celui observé chez PB 217 ; dans ce cas, l'énergie métabolique disponible diminue ce qui fait décroître sensiblement le pompage actif du saccharose. Ce clone, s'il est trop exploité, peut donc avoir une alimentation en sucre limitante. Dans des conditions normales, il est cependant logique qu'il réponde mieux que le PB 235 à la stimulation, mais qu'il soit aussi plus sensible à l'encoche sèche que le PB 217.

L'activité métabolique du système laticifère détermine l'intensité de «l'effet d'appel» (*sink*) développé au niveau de l'écorce exploitée ; elle est un élément



important qui contrôle la production. Les clones présentant un métabolisme actif, comme le PB 235, sont par essence de bons producteurs. En effet, la régénération de leur latex et son écoulement, phénomènes nécessitant de l'énergie (Jacob *et al.*, 1988), sont efficaces. En corollaire, ils répondent peu à la stimulation, inductrice d'activité métabolique, et peuvent manquer de réserves glucidiques, cause possible de dysfonctionnement et d'encoche sèche. Au contraire, les clones comme le PB 217 ont un métabolisme plus lent, mais également une disponibilité en sucre élevée. Leur exploitation nécessite donc une activation de leur métabolisme par une stimulation relativement soutenue, afin d'exploiter au mieux leur potentiel de production en accélérant leurs mécanismes d'écoulement et de régénération. Ils sont, par ailleurs, logiquement plus résistants aux stress induits par la stimulation à l'éthylène.

Entre ces deux types de clones, au fonctionnement métabolique très contrasté, se situent d'autres clones comme le GT 1 dont les qualités sont intermédiaires.

Ces résultats qui confirment et complètent d'autres travaux (Jacob *et al.*, 1988) soulignent une fois encore, la nécessité de prendre en compte la caractéristique métabolique des clones pour adapter la méthode d'exploitation qui doit leur être appliquée. ■

## Bibliographie / References

- D'AUZAC J., PUDARNISCLE S., 1959. Les glucides de l'*Hevea brasiliensis*, étude qualitative. Rev. Gén. Caoutch. Plast. 36 : 1687-1691.
- BOUTEAU F., 1994. Canaux K<sup>+</sup> et symports H<sup>+</sup>-sucre. Implication dans la régénération du latex chez les laticifères d'*Hevea brasiliensis*. Thèse de doctorat, université Paris VII, France, 133 p.
- CHRESTIN H., 1985. La vacuole dans l'homéostasie et la sénescence des cellules laticifères d'*Hevea*. Paris, France, ORSTOM, coll. Etudes et thèses, 575 p.
- ESCHBACH J.M., ROUSSEL D., VAN DE SYPE H., JACOB J.L., D'AUZAC J., 1984. Relationship between yield and clonal physiological characteristics of latex from *Hevea brasiliensis*. Physiol. Vég. 22 : 295-304.
- HELL R., BERGMAN, L., 1990.  $\alpha$ -glutamyl cysteine synthetase in higher plants : catalytic properties and subcellular localization. Planta 180 : 603-652.
- JACOB J.L., PRÉVOT J.C., D'AUZAC J., 1982. Physiological activators of invertase from *Hevea brasiliensis* latex. Phytochem. 21 : 851-853.
- JACOB J.L., PRÉVOT J.C., ESCHBACH J.M., LACROTTE R., SERRES E., VIDAL A., 1988. Latex flow, cellular regeneration and yield of *Hevea brasiliensis*. Influence of hormonal stimulation. In : International congress of plant physiology, New Delhi, Inde, 15-20 fév. 1988. New Delhi, Inde, Society for plant physiology and biochemistry, p. 426-433.
- JACOB J.L., PRÉVOT J.C., KEKWICK, R.G.O., 1989a. General metabolism of *Hevea brasiliensis* latex. In : Physiology of rubber tree latex, J. d'Auzac, J.L. Jacob et H. Chrestin éd., Boca Raton, Etats-Unis, CRC Press, p. 101-144.
- JACOB J.L., PRÉVOT J.C., ROUSSEL D., LACROTTE R., SERRES E., D'AUZAC J., ESCHBACH J.M., OMONT H., 1989b. Yield limiting factors, latex physiological parameters, latex diagnosis and clonal typology. In : Physiology of rubber tree latex, J. d'Auzac, J.L. Jacob et H. Chrestin éd., Boca Raton, Etats-Unis, CRC Press, p. 345-382.
- KLAPHELK S., RENNENBERG H., 1990. Sulphur metabolism. Synthesis of glutathione. In : Methods in plant biochemistry, 3 : Enzymes of primary metabolism, P.J. Lea éd., Londres, Grande-Bretagne, Academic Press, p. 355-359.
- LACROTTE R., MONESTIEZ M., CORNEL D., BOUTEAU F., RONA J.P., 1991. Loading mechanisms of laticiferous cells by an electrophysiological method. In : Physiology and exploitation of *Hevea brasiliensis*, Kunming, Chine, 6-7 oct. 1990. Brickendonbury, Royaume-Uni, International Rubber Research and Development Board, p. 26-35.
- LYNEN F., 1969. Biochemical problems of rubber synthesis. J. Rubber Res. Inst. Malays. 21 : 851-853.
- McMULLEN A.I., 1960. Thiols of low molecular weight in *Hevea brasiliensis* latex. Biochem. Biophys. Acta 41 : 152-156.
- PRÉVOT J.C., CHRESTIN H., JACOB J.L., 1984. Mise en évidence d'une glutathion réductase dans le sérum cytoplasmique du latex d'*Hevea brasiliensis*. C.R. Acad. Sci. Paris, série 3 (298) : 35-38.
- PRÉVOT J.C., JACOB J.L., LACROTTE R., VIDAL A., SERRES E., 1988. Physiological parameters of latex from *Hevea brasiliensis*. Their uses in the study of laticiferous system. Typology and functioning production mechanisms. Effect of stimulation. In : IRRDB rubber physiology and exploitation meeting, Hainan, Chine, 9-12 déc. 1986. Hainan, Chine, South China Academy of Tropical Crops, p. 136-157.
- SERRES E., CLÉMENT-VIDAL A., PRÉVOT J.C., JACOB J.L., COMMERE J., LACROTTE R., ESCHBACH J.M., 1988. Clonal typology of laticiferous producing vessels in *Hevea brasiliensis*. Colloque exploitation-physiologie et amélioration de l'hévéa, Paris, France, 2-7 nov. 1988. Montpellier, France, IRCA-CIRAD, p. 231-246.
- TUPY J., RÉSING W.L., 1968. Anaerobic respiration in latex of *Hevea brasiliensis*, substrate and limiting factors. Biol. Plant. 10 : 72-80.
- TUPY J., 1989. Sucrose supply and utilization for latex production. In : Physiology of rubber tree latex, J. d'Auzac, J.L. Jacob et H. Chrestin éd., Boca Raton, Etats-Unis, CRC Press, p. 179-199.

# Clonal typology of laticifer functioning in *Hevea brasiliensis*

Jacob J.L., Prévôt J.C., Lacrotte R., Clément A., Serres E., Gohet E.

CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

Two factors may limit latex production in *Hevea brasiliensis*: its flow and its regeneration. The easier and longer the flow, the greater the yield. *in situ* latex regeneration must be sufficiently active to compensate for the loss of cell material between two tappings. It thus plays a major role in the production potential of rubber trees.

Although the general regeneration processes are now known (Jacob *et al.*, 1989a), their operating dynamics have been found to be clone-dependent and largely account for their production characteristics (Serres *et al.*, 1988).

A kinetic study of latex regeneration against time between two tappings, taking various biological parameters of latex into account, was performed on GT 1 (Jacob *et al.*, 1988). It showed the relation between biochemical activity of the laticiferous system and the reconstitution of its contents. The work reported here compared these kinetics under similar conditions in three clones with distinctly contrasting metabolic functioning: PB 235, GT 1 and PB 217. The results are discussed according to the characteristics of each of these clones to produce and to react after Ethrel treatments used to stimulate their production.

## Material and methods

The three clones studied, GT 1, PB 235 and PB 217, were in their fourth year of tapping. The tapping cuts were on virgin bark at the same height on the trunk (60 cm from the ground). Groups of 10 trees of each clone, each forming a treatment, were tapped in a half spiral (1/2S) at 6 different frequencies: every day (d/1), every 2 days (d/2), every 3 days (d/3), every 4 days (d/4), every week (d/7) and every 2 weeks (d/14). There was no tapping on Sundays, the days considered being working days. The latex collected between the 5th and the 35th minute of tapping flow was analysed.

The parameters studied: dry extract (DE), inorganic phosphorus (Pi), thiols (R-SH) and sucrose (SUC) were analysed in fresh latex using methods which have already been described (Eschbach *et al.*, 1984).

The analyses described were performed 3 months after the start of the experiment to ensure that the various treatments were balanced in relation to the 1/2S d/4 tapping previously used for the trees.

## Results

### Dry extract (DE)

This parameter reflects latex regeneration in the laticifers. In all three clones, DE increased in line with the interval between two tappings. Indeed, the reconstitution of cell material, above all cispolysoprene which forms over 90% of the dry extract logically takes a certain amount of time to be complete (figure 1). It can be seen that the kinetics obtained are all asymptotic but different for each clone.

The values recorded for daily tapping of PB 235 were higher than in GT 1 and PB 217 and moved fairly rapidly from 40 to 50%. At d/4, DE was already fairly close to that recorded at d/14.

In contrast, PB 217 stands out with values ranging from 31% at d/1 to 51% at d/14, and DE was significantly lower at d/7 than at d/14, thus revealing continued *in situ* regeneration during this period.

GT 1 was in an intermediate position.

It is thus clear that the regeneration process is faster in PB 235 than in clone GT 1 and especially faster than in clone PB 217.

### Inorganic phosphorus content (Pi)

The Pi content is often related to the metabolic activity of the laticiferous system (Jacob *et al.*, 1989b). Pi is involved in the energy processes of cellular anabolism and particularly in isoprenic synthesis through adenosine phosphates and pyrophosphate bonds (Lynen, 1969). It is logical in this respect that the latex from daily tapping, in which the laticiferous system is more active, should have the highest Pi contents. The values tend to fall with the increase in the interval between tappings (figure 2), which corresponds to a slowdown in metabolic activity. The decrease was slight in GT 1 and noticeable above all between d/1 and d/3 in PB 235, but was extremely significant in PB 217 where the Pi content was very low in the latex from trees tapped at d/14.

It should also be noted that in latex from trees tapped at d/1, PB 235 displayed the highest Pi contents, followed by GT 1 and then PB 217. These results confirm previous findings (Serres *et al.*, 1988) and the relationship between latex phosphate contents and the metabolic activity in the tapped laticiferous system.

### Thiols content (R-SH)

Thiols play an important role in the laticifers. They may activate certain key enzymatic systems

of the metabolism such as invertase (Jacob *et al.*, 1982), but above all protect the structure of subcellular organelles and their ability to function by trapping molecules of toxic oxygen generated by certain harmful enzymes (Chrestin, 1985).

The R-SH consist of cysteine and particularly reduced glutathione (McMullen, 1960). The latter forms 50 to 80% of all thiols, depending on the clone (Clément, personal communication). Their turnover in latex is complex. It is governed by the systems able to oxidize them and those able to regenerate them in their reduced form, such as glutathione reductase (Prévôt *et al.*, 1984) and also to synthesize them from glutamate and cysteine. The latter process requires biochemical energy in the form of ATP (Hell and Bergman, 1990).

In all cases, the R-SH content is higher in latex from daily tappings (figure 3) in which there is greater metabolic activity hence more available biochemical energy. In the most biologically active laticiferous systems, the high concentrations found probably result from greater R-SH synthesis, and especially that of glutathione. This synthesis easily compensates for the oxidative processes which are in turn accelerated by metabolic activation caused by tapping or by stimulation (Chrestin, 1985). When the tapping frequency decreases, implying regeneration more spread out in time and lower metabolic activity, the R-SH concentrations decrease and then stabilize. This balancing phenomenon is attained rapidly in PB 235 (right from d/2), more slowly in GT 1 (at d/3) and only at d/7 in PB 217. These differences in kinetics can be seen against the gradient of metabolic activity observed in the three clones in the case of DE regeneration (figure 1).

### Sucrose content (SUC)

Sugar, mainly in the form of sucrose (Tupy and Réding, 1968; d'Auzac and Pudarniscle, 1959), is the basic molecule of the laticiferous metabolism since it is the initial substrate in isoprenic synthesis and in the processes capable of producing the biochemical energy required for the *in situ* regeneration of latex, such as glycolysis. The activity of the laticiferous tissue may thus depend on the availability of sucrose (Tupy, 1989).

The sugar content of latex results from its supply and *in situ* utilization.

Sucrose penetration into the laticifers is complex and, as in many plants, involves mechanisms at plasmalemma level which require biochemical energy (Klaphelk and Rennenberg, 1990). Recent work (Lacrotte *et al.*, 1991; Bouteau, 1994) has shown that a membrane ATPase linked to *in situ* penetration of sucrose exists in rubber trees.

It is interesting to observe that the kinetics of the variation in sucrose concentrations according to tapping intervals are totally different in the three clones studied (figure 4).

The sucrose contents of PB 235 latex remained low at all times.

GT 1 tapped at d/1 had the lowest sucrose content. In this case, where the demand on the laticiferous system was highest, sucrose utilization was very rapid. Regeneration decreased when tapping was performed at longer intervals, but the loading process was continuously active and accounts for the increase in the sucrose content. The increase was maximum for a 4-day tapping interval, then stabilized and subsequently tended to decrease.

In PB 217, the latex sucrose content decreased in proportion to the increase in the tapping interval. It was very high in trees tapped every day, where demand on the laticifers was high and the metabolism was intense, then fell significantly to only 30% of the maximum value in trees tapped at d/14.

#### Production per tree and per tapping, and cumulated yields

The results concerning production per tree per tapping (figure 5) reveal an analogy between clones GT 1 and PB 217. The trees tapped every day gave the lowest daily yields. The time elapsing between two harvests was too short for the contents of the laticifers to be totally regenerated. The optimum was between d/3 and d/4 with, in this case, significantly higher values. At d/14, yields tended to decrease, confirming the previous results obtained for GT 1 (Jacob *et al.*, 1988).

In PB 235, not only yield per tree and per tapping was higher with daily tapping (43 g) than in the other two clones (30 and 33 g for PB 217 and GT 1 respectively), but the increase in this parameter at longer tapping intervals was less. In other words, the regeneration phenomenon was more rapid, confirming that metabolic activity was more intense.

For all clones, the most frequent tapplings caused more intense metabolic activity to compensate for greater loss of cell material, finally resulting in greater cumulated yield (Table 1).

Correlatively, tapping at longer intervals resulted in distinctly lower cumulated yields, implying a lower regeneration effort. Moreover,

on the whole, cumulated yields were highest in PB 235 and lowest in PB 217. GT 1 yields were in between.

#### Conclusions

This study of latex characteristics and yields according to different tapping intervals has provided data on the kinetics of *in situ* regeneration and the physiological state of the laticiferous system.

The parameters studied tend to confirm this pattern of metabolic activity according to tapping frequency. The asymptotic curves showing the variations in DE show that synthesis tends to slow or even stop when the interval between two tapplings is sufficiently long. The R-SH contents, whose reconstitution requires biochemical energy, also decrease in laticifers on which less demand is made and which are consequently metabolically less active. The variation in Pi content, a reflection of laticifer metabolic activity, confirm these results.

However, the variations in sucrose contents show that the three clones react differently and possess their own metabolic functioning.

PB 235 latex always contains low sucrose concentrations. Its high yield, high DE, high Pi and rapid regeneration between two tapplings show that biosynthetic activity is intense, implying rapid utilization of sucrose, accounting for the low levels observed. Nevertheless, the low level also results from sucrose availability and loading which barely compensate for the amounts used. For PB 235, whose easy flow and good yields are accompanied by high metabolic activity in its laticifers, this characteristic may also be considered a handicap. Indeed, if over-tapping leads to even greater sugar consumption, the carbohydrate supply might become inadequate and risk causing cellular malfunctioning. The fairly weak response of PB 235 to stimulation and its tendency to develop tapping panel dryness, particularly after Ethrel treatments, should be remembered in this connection.

The case of PB 217 is very different. Indeed, the sucrose content is highest in the laticiferous systems tapped most intensively. Under these conditions, the sugar supply systems function more rapidly than its metabolism. The phenomenon is probably a result of maximum activation of the pumping processes involved in loading (such as the plasmalemma ATPase), combined with a more plentiful carbohydrate supply. With the slowing down of the metabolism induced by increasing the tapping interval, sucrose transfer to the cell decreases and the supply-utilization balance leads to a significant decrease in the sugar concentration. This characteristic of a generally less active laticiferous metabolism combined with greater

usable carbohydrate reserves may account for the lower yield of non-stimulated PB 217 (Table 1), but also to its good response to Ethrel treatment, its resistance to tapping panel dryness when relatively intensely stimulated and its high production potential (Serres *et al.*, 1988).

GT 1 is an intermediate case. Examination of the evolution in sucrose content reveals the lowest values in latex from daily tapping. It then tends to increase considerably up to d/4 as the sugar supply becomes greater than its utilization. Beyond this tapping frequency, the balance between the processes becomes stable, although a tendency for the carbohydrate level to decrease at d/14 is a sign that the phenomenon observed in PB 217 might occur with longer tapping time intervals; in this case, available metabolic energy diminishes, which substantially reduces active sucrose pumping. If this clone is over-tapped, the sugar supply may become a limiting factor. However, under normal conditions it is logical that it should respond better to stimulation than PB 235, and also that it should be more sensitive to tapping panel dryness than PB 217.

The metabolic activity of the laticiferous system determines the intensity of the sink developed in the tapped bark; it is an important factor which controls production. Clones with an active metabolism like PB 235 give good yields naturally. Their latex regeneration and flow, which both require energy (Jacob *et al.*, 1988), are efficient. However, they also respond poorly to stimulation, which induces metabolic activity, and may lack carbohydrate reserves, which is a possible cause of malfunctioning and, maybe, tapping panel dryness.

In contrast, clones such as PB 217 have slower metabolism but accompanied by high levels of available sugar. Tapping therefore requires activation of their metabolism by fairly intensive stimulation to make the most of their production potential by accelerating their flow and regeneration mechanisms. They are also logically more resistant to stress caused by stimulation with ethylene.

Other clones such as GT 1, with intermediate features, are situated between these two types of clones with highly contrasted metabolic functioning.

These results, which confirm other research (Jacob *et al.*, 1988), highlight once again the need to take the metabolic characteristics of clones into account in designing a suitable tapping method. ■